

学校编码: 10384

密级_____

学号: 24520091153049

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

基于 OEA 结构的降血脂药物的设计、合成
和筛选

Design, synthesis and screening of hypolipidemic agents
based on the structure of OEA

指导教师姓名 :	韩大雄副教授
专 业 名 称 :	药物化学
论文提交日期 :	2012 月
论文答辩时间 :	2012 月
学位授予日期 :	2012 月

答辩委员会主席:

评阅人:

2012 年 月

基于 OEA 结构的降血脂药物的设计合成和筛选

晋慧

指导教师

韩大雄

副教授

厦门大学

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其他方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

缩略语

Abbreviation	Full Name
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptors
OEA	N-oleoylethanolamine
NAAA	N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase
FAAH	Fatty acid amide hydrolase
NAE	N-acylethanolamines
OEA	N-oleoylethanolamine
PEA	Palmitoylethanolamine
SEA	N-stearoylethanolamine
AEA	Anandamide
PBS	Phosphate buffered solution
^1H -NMR	^1H Nuclear magnetic resonance
^{13}C -NMR	^{13}C Nuclear magnetic resonance
δ	Chemical shift
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
q	Quartet
s	Singlet
t	Triplet
m	Multiplet
TC	Total cholestrol
TG	Total triglyceride

摘要

OEA(Oleoylethanolamide)是内源性不饱和脂肪酰乙醇胺,其可通过激动过氧化物酶体增殖活化受体 PPAR- α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors)而产生降低食欲,促进脂质代谢,调节脂质平衡,调节能量代谢的生理活性。这一重要生理活性使 OEA 成为降血脂药物的新型先导化合物,然而, OEA 作为内源性脂质极易被体内脂肪水解酶类如 NAAA、FAAH 所降解,而失去激动 PPAR- α 的能力,从而失去调节脂代谢的能力。因此,设计筛选一些既有良好的降血脂活性又抑制酶增加内源性 OEA 水平的衍生物对新型多靶点降血脂药物的研究有重要意义。

OEA 结构特点明显,分为极性头部、中间连接部分和疏水性尾部,可改造部位较多,为了全面研究各部分基团改造和由此而产生的不同组合化合物的活性,本文将先导化合物 OEA 结构合理分割,通过分子片段的替换,获得多种结构的一系列的小分子片段,通过片段组合设计了 36 种化合物进行进一步合成和生物活性测定。

① 本论文设计合成了 36 种化合物,并利用 MS、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 对化合物进行了结构鉴定;利用熔点和 LC-MS 对化合物的纯度进行了鉴定。

② 将 36 种化合物分别利用小鼠急性高血脂模型,以总胆固醇、总甘油三酯为指标进行降血脂活性筛选,结果表明,多数化合物均有较好的降血脂活性,尤其以化合物 N31 和 N16,降低血清总甘油三酯分别为 81.06 %、83.66 %;降低血清中总胆固醇分别为 72.09 %、77.49 %。

③ 将已获得的 36 种化合物进行体外酶活实验检测,结果表明 36 种化合物均有较好的抑酶活性,化合物 N9 和 N16 的酶抑制活性尤其明显。化合物 N9 和 N16 在体外 100 μM 对 FAAH 酶的抑制率分别为 98.35 %和 84.90 %;对 NAAA 酶的抑制率分别为 80.82%和 95.58 %。其中,化合物 N9、N16 对 FAAH 的抑制的 IC_{50} 分别为 22.48 μM 和 22.56 μM ;对 NAAA 的抑制, IC_{50} 分别为 18.55 μM 和 10.68 μM 。

④ 为进一步探讨化合物的结构和活性之间的关系,本论文分别以降低血清胆固醇和甘油三酯的百分率为生物活性,构建了 CoMFA 模型。模型中交叉验证

系数 q^2 分别为 0.447 和 0.505, 相关系数 r^2 分别为 0.974 和 0.968, 标准偏差 SEE 分别为 3.372% 和 3.258%, F 值分别为 166.197 和 136.554, 表明模型可信度高。在此模型基础上, 根据化合物结构, 探讨了化合物结构活性关系, 并为进一步新药设计提供可靠依据。

在以上工作基础上, 本论文筛选到既有较高降血脂活性, 又耐酶降解的化合物 N9 和 N16, 符合实验设计的初衷, 并且对于新型双靶点降血脂药物的筛选有进一步研究价值。

关键字: 油酰乙醇胺; 过氧化物酶体增殖活化受体; N-酰基乙醇胺水解酸酰胺酶; 脂肪酰胺水解酶

Abstract

Oleoylethanolamide (OEA), an endogenous unsaturated fatty acid ethanolamide, can inhibit food intake, promote lipolysis, regulate lipid metabolism and energy expenditure by activating peroxisome proliferator-activated receptors α (PPAR- α).

These bioactivities of OEA make it a new lead compound with hypolipidemic activity. However, OEA is easy to be hydrolyzed by fatty acid amide hydrolase (FAAH) and N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA), and lose its activity. So design and screening of some compounds which can activate PPAR- α as well as resist the hydrolysis of NAAA and FAAH are of meaning and important for the development of new-type hypolipidemic agents.

The structure of OEA has obvious features including three parts : hydrophilic head, linker and hydrophobic tail. Every of these three parts can be modified. In order to get extensively structure- activity relationship, we divide the lead compound into three parts (i.e.A, B and C) reasonably, provide several alternative function groups for every part, assembly different function groups from part A, B and C into 36 molecules according to the structure of reported PPAR- α agonists.

① In this article, we have synthesized 36 compounds. The structures of the synthesized new compounds have been identified by mass spectrum, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ and melting points.

② The hypolipidemic activity of the synthesized compounds was evaluated by Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice as an experimental model. Most of the tested compounds significantly reduced the levels of total cholesterol (TC) and total triglycerides (TG) in the plasma at 100mg/Kg oral dose. It is noteworthy that N9 and N16 exhibit superior hypolipidemic activity to OEA, while the other compounds have equal or less hypolipidemic activity. More surprisingly is the result obtained with “N31 and N16”, which can reduce plasma TC and TG by 81.06 % and 83.66 % , 72.09 % and 94.70 % respectively. Under the same condition, fenofibrate can lower the plasma TC and TG by 74.3 % and 91.35 %. It is mean that N31 and N16 are slightly more efficient than fenofibrate which is known as a good hypolipidemic agent in human for several decades.

③ In a separate series of experiments, all 36 compounds were assessed for their ability to inhibit FAAH and NAAA. The results show that all of these compounds can inhibit FAAH and NAAA more or less. Compounds N9 and N16 show more high potential activities against FAAH and NAAA. They can inhibit FAAH by 98.35 % and 84.90 % respectively, along with inhibiting NAAA by 80.82% and 95.58 % at 100 μ M. Compounds N9 and N16 inhibit FAAH with IC₅₀ values of 22.48 μ M and 22.56 μ M, and inhibit NAAA with IC₅₀ values of 18.55 μ M and 10.68 μ M on NAAA.

④ To further study the structure- activity relationship, we established two CoMFA models using reduction percentages of plasma TC and TG as biological activities, respectively. Of these two models, q^2 (Cross-validated correlation coefficient) are 0.447 and 0.505 respectively; r^2 (Non cross-validated correlation coefficient) are 0.974 and 0.968 respectively; SEE (Standard error of estimate) are 3.372 % and 3.258 % respectively; F- test value are 166.197 and 136.554 respectively. These parameters indicate that both of the two models are high in reliable. Based on the comparison between models and compounds structures, we obtain some important structure- activity relationships which will be useful for the design of new hypolipidemic agents.

On the basis of above work, we screened compounds N9 and N17 with superior activities of lowering hyperlipidemia and resistant hydrolysis enzyme, will be useful as new templates to design new and potent hypolipidemic agents.

Keywords: OEA, PPAR- α , NAAA, FAAH

目录

缩略语	I
摘 要	II
英文摘要	IV
目录	VI
第一章 前言	1
1.1 高血脂症及降血脂药物研究进展	2
1.2 OEA 的研究进展	5
1.2.1 动物组织中 OEA 的代谢	5
1.2.2 OEA 的作用靶点	7
1.2.3 OEA 的生物活性	9
1.2.4 OEA 衍生物的研究进展	12
1.2.5 FAAH 和 NAAA 生理功能	13
1.2.6 PPAR- α 受体及其生理功能	15
参考文献	16
第二章 基于 OEA 结构的降血脂药物的设计	24
第三章 目标化合物的合成	29
3.1 合成路线的选择	29
3.1.1 酰胺类和酯类化合物合成路线	29
3.1.2 磺酰胺类化合物合成路线	35
3.2 目标化合物的合成	36
3.2.1 仪器与设备	36
3.2.2 化合物 N17-N21 的合成	36
3.2.3 化合物 N22-N31 的合成	40
3.2.4 化合物 N32-N36 的合成	45
3.3 本章小结	49
参考文献	49
第四章 化合物生物活性检测	50

4.1 体内降血脂活性筛选	50
4.1.1 实验材料	50
4.1.2 实验方法	51
4.1.3 实验结果及讨论	54
4.2 体外抑酶活性筛选	60
4.2.1 实验材料	61
4.2.2 实验方法	62
4.2.3 实验结果及讨论	64
参考文献	71
第五章 化合物构效关系探讨--CoMFA 分析	72
5.1 CoMFA 基本原理	72
5.2 实验方法	73
5.3 小结	77
参考文献	79
总结与展望	80
在校期间发表论文	82
附录	83
致谢	104

Table of Contents

Abbreviation	I
Abstract in Chinese	II
Abstract in English	IV
Contents	VI
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Advaces in hypolipidemic agents	2
1.2 Advaces in OEA research	5
1.2.1 OEA metabolism in animal tissues	5
1.2.2 Targets of OEA	7
1.2.3 Biological activity of OEA	9
1.2.4 Advaces in OEA derivatives	12
1.2.5 FAAH and NAAA	13
1.2.6 PPAR- α and its function	15
References	16
Chapter2 Design of hypolipidemic agents based on OEA	24
Chapter 3 Synthesis of title compounds	29
3.1 Synthesis Routes	29
3.1.1 Synthesis Routes of fatty acid amide and ester compounds	29
3.1.2 Synthesis Routes of fatty acid sulfuramide compounds	35
3.2 Synthesis of title compounds	36
3.2.1 Instruments and Apparatus	36
3.2.2 Synthesis of compounds N17-N21	36
3.2.3 Synthesis of compounds N22-N31	40
3.2.3 Synthesis of compounds N22-N31	40
3.2.4 Synthesis of compounds N32-N36	45
3.3 Conclusion	49
References	49
Chapter 4 Evaluation of biological activity	50
4.1 Screening of new compounds	50
4.1.1 Materials	50

4.1.2 Methods.....	51
4.1.3 Results and discussion	54
4.2 Screening of new compounds against FAAH and NAAA	60
4.2.1 Materials	61
4.2.2 Methods.....	62
4.2.3 Results and discussion	64
References	71
Chapter 5 Research on structure-activity relationship	72
5.1 Principle of CoMFA.....	72
5.2 Materials and Methods	73
5.3 Results.....	73
References	73
Summary and prospects	80
Publications	82
Appendix	83
Acknowledgements	104

第一章 前言

心血管疾病是当今世界威胁人类健康最严重疾病之一。中华医学会数据表明,全球每年有 1200-1600 万人死于动脉粥样硬化、冠心病等各类心血管疾病^[1]。临床和实验研究表明,高血脂症是造成各种心血管疾病的主要因素^[2]。因此高效的降血脂药对于心血管及其相关并发症的预防和治疗具有重要意义。

高血脂症一般表现为血清总胆固醇 (Total cholesterol) 或甘油三脂 (Total triglycerides) 高于正常值,或血清高密度脂蛋白-胆固醇低于正常值。目前临床使用的降血脂药多以化学合成药为主,具有代表性的有胆汁酸螯合剂、烟酸类、他汀类、贝特类等。然而,各种不良反应一直困扰着这几类降血脂活性良好的药物^[3]。以他汀类为例,其主要不良反应为转氨酶升高和骨骼肌毒性,2001年拜耳公司就曾因横纹肌溶解致死事件撤回已上市的“拜斯亭”(西立伐他汀)。除此之外的各类化学合成药都有不同的副反应,因而研究剂量小、疗效好、不良反应少的新型降血脂药物成为发展重点。

OEA(Oleylethanolamide) (Figure 1) 是一种内源性脂代谢调节器,它具有减少食物摄入,促进脂代谢、降低体重的药理活性^[4]。2003 年 FUJ.及其同事发现了 OEA 以低浓度 ($EC_{50}=120nm$) 高亲和力方式激动 PPAR- α (Peroxisome proliferator activated receptor- α) 受体产生饱足感信号从而减少食物摄入, OEA 第一次被证实是 PPAR- α 受体的内源性激动剂^[5]。2004 年该课题组报导在大鼠脂肪细胞中 OEA 有明显的脂降解作用,同时大鼠的体内实验也证明腹腔注射 5mg/Kg 的 OEA 能产生与腹腔注射 20mg/Kg PPAR- α 合成激动剂 Wy-14643 相同的降血脂效果^[6]。该课题组一系列的实验证明,内源性 OEA 与同是 PPAR- α 激动剂的贝特类药物相比,降血脂效果更好,而且有明显的抑制食物摄取的作用。此后,基于 OEA 结构的新化合物的设计和合成以及其降低体重活性的筛选成为研究焦点。2006 年 Astarita 及其同事筛选到一种 OEA 类似物 KSD-5104 具有比 OEA 的作用更强的 PPAR- α 激动作用 ($EC_{50}=100nM$) ^[4]。2007 年 Cano 及其同事进行了一系列 OEA 的硫酰胺类似物的合成和生物活性检测,其中化合物 N-(propylsulfamoyl)heptadecan-1-amine,在激动 PPAR- α ($EC_{50}=100nM$) 和减少

食物摄取方面活性较好^[7]。此外，内源性物质 OEA 毒副作用较低（最大耐受量 $\geq 5\text{g/Kg}$ ），的特点使之成为降血脂药的又一种新的先导化合物。

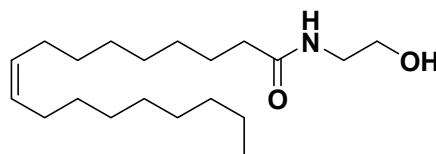


图 1 OEA 结构

Figure 1 Structure of OEA

1.1 高血脂症及降血脂药物研究进展

高血脂症是由于脂质代谢异常而引起的心血管疾病，表现为血清总胆固醇、总甘油三酯、低密度脂蛋白过高和高密度脂蛋白过低^[8]。临床研究表明高脂血症引起的动脉粥样硬化是造成冠心病、高血压等心脑血管疾病发生和死亡的主要原因^[9]。因此寻找高效低毒的降血脂药物一直是高血脂症研究领域的热点。降血脂药是一类能降低血清中胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白含量同时升高高密度脂蛋白含量的药物^[8]。目前用于临床的降血脂药按作用机理可分为：羟甲戊二酰辅酶 A 还原酶(HMG-CoA)抑制剂、贝特类、烟酸类、胆汁酸螯合剂、胆固醇吸收抑制剂以及胆固醇酯酰转移酶(ACAT)抑制剂^[10]和固醇断裂活化蛋白(SCAP)配体^[11]。

羟甲戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂即他汀类降血脂药，该类药物通过抑制胆固醇生物合成的限速酶--羟甲戊二酰辅酶 A 还原酶，而抑制胆固醇的合成^[13]，是目前临床上主要的降低高胆固醇血症的药物^[14]。他汀类降血脂药起源于 20 世纪 80 年代，迄今为止已经发展了三代。第一代他汀类降血脂药是从微生物代谢产物的提取物，代表性的药物是洛伐他汀(Figure 2)^[15]；第二代他汀类降血脂药主要是天然产物经过修饰之后的半合成药物，如：阿托伐他汀(Figure 3)^[16]；第三代他汀类降血脂药物是全合成的化学药。如氟伐他汀、西立伐他汀(Figure 4, 5)，后者因致横纹肌溶解被撤回^[17]。他汀类降血脂药由于降血脂效果明显，选择性高，用药相对安全，但致转氨酶升高、肌肉毒性、肠胃毒性和肾毒性是一直困扰研发者的主要副作用^[18]，也阻碍了新的他汀类药物的快速更新。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库